



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2003년 제 0078503 호
Application Number 10-2003-0078503

출원년월일 : 2003년 11월 07일
Date of Application NOV 07, 2003

출원인 : 주식회사 엔바이오테크놀러지
Applicant(s) EN-BIO TECHNOLOGY CO.,LTD.

CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

2004년 11월 15일

특허청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【제명】 특허 출원서
【권리구분】 특허
【신청】 특허청장
【출원일자】 2003.11.07
【명의 영명】 신경세포 보호 활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는
뇌질환 예방 및 치료용 조성물
【명의 영문명칭】 COMPOSITION COMPRISING GRAPE SEED EXTRACT HAVING
NEURONAL CELL-PROTECTING ACTIVITY FOR PREVENTING AND
TREATING BRAIN DISEASE
【출원인】
【영명】 주식회사 엔바이오테크놀러지
【출원인코드】 1-2000-015825-7
【대리인】
【성명】 신동인
【대리인코드】 9-2000-000156-1
【포괄위임 등록번호】 2002-082819-1
【영자】
【성명】 문원국
【출원인코드】 4-2002-042164-9
【영자】
【성명】 김동우
【출원인코드】 4-1998-603002-3
【영자】
【성명】 원무호
【출원인코드】 4-2000-033974-1
【영자】
【성명의 국문표기】 황인구
【성명의 영문표기】 HWANG, In-Koo
【주민등록번호】 760313-1024818
【우편번호】 130-022
【주소】 서울특별시 동대문구 전농2동 103-69
【국적】 KR
【시청구】 청구

부지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 등 청구합니다. 대리인
신동인 (인)

수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 7 면 7,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 6 항 301,000 원

【임계】 337,000 원

【김면시유】 중소기업

【김면 후 수수료】 168,500 원

【부서류】 1. 요약서_명세서(도면)_1종 2. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1종

【요약서】

【약】

본 발명은 뇌허혈에 의해 유도되는 신경세포손상 보호용 포도씨 추출물 및 이 포함하는 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 포도씨 추출물은 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 저해하는 효과가 원할 뿐만 아니라 인체에 무해하여, 신경세포의 사멸에 의해 발생되는 뇌질환을 예 및 치료하기 위한 의약품 및 건강기능식품으로 사용할 수 있다.

【표도】

도 5

【인어】

질환, 신경세포사, 뇌허혈억제물질, 포도씨

【명세서】

【설명의 명칭】

신경세포 보호 활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조
종(COMPOSITION COMPRISING GRAPE SEED EXTRACT HAVING NEURONAL CELL-PROTECTING
IVITY FOR PREVENTING AND TREATING BRAIN DISEASE)

【면의 간단한 설명】

도 1은 포도씨 추출물을 PC12 세포주에 투여한 다음, 저산소환경시 신경세포사
지효과를 락테이트 디하이드로케나제 (LDH) 측정 실험으로 확인한 것이다.

도 2는 뇌허혈-재판류 유발 4일 후에 정상군 (A, C)과 용매만을 투여한 대조군
. D) 실험동물의 뇌조직 중 해마부분을 염색한 사진으로, C와 D는 A와 B의 CA1 영
민을 400배로 확대 촬영한 사진이다.

도 3은 포도씨 추출물을 허혈-재판류 실시 30분전 (A 및 C) 또는 실시 30분후 (B
D)에 실험동물에 투여하고 4일 후 실험동물의 해마조직을 염색한 사진이다.

도 4는 도 3에서 관찰한 해마조직 중 CA1 영역만을 400배로 확대한 관찰한 사진
다.

도 5는 포도씨 추출물을 허혈-재판류 실시 30분전 또는 실시 30분 후에 실험동
에 투여한 다음, 4일 후에 살아남은 세포를 계수하여, 정상군과 비교하여 나타낸
그래프이다.

발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 신경세포 보호활성이 있는 포도씨 추출물을 포함하는 뇌질환 예방 및
료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PC12 세포주 및 동물모델에서 뇌허혈
●판류 후에 유발되는 해마 뇌세포의 광범위한 손상을 예방하거나 개선하는 작용을
지닌 포도씨 추출물 및 이의 뇌질환 치료 및 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

통계청에서 2003년 10월 발표한 우리나라 노령 인구의 비율을 살펴보면, 우리나라
는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2%에 이르러 고령
사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14%를 넘어 고령사회에 진입할 것
로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라
1령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이
이치고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다. 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구
증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성전염성질병보다는
성퇴행성 질병이 더욱더 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다. 특히 만성퇴행성 질병
에서 뇌혈관질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있
매우 중요한 질환이다. 뇌혈관질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는
출혈 등에서 볼 수 있는 있는 출혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 뇌혈관의 폐색 등에

해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 출혈성 뇌질환은 교통사고 등에서 의해서 주로 나나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노령의 사람들에서 자주 나타나는 질환이다.

대뇌에 임시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신세포에서는 ATP 감소, 부종 (edema)이 발생되며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있은 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 연성 신경세포사 (delayed neuronal death)라고 한다. 자연성 신경세포사는 몽골리저빌 (Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델 (transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마 hippocampus의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다 (Kirino Sano K. *Acta Neuropathol.*, 62, pp201-208, 1984; Kirino T. *Brain Res.*, 239, 57-69, 1982).

지금까지 가장 많은 사람들이 받아들이는 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포 바깥에 과도한 글루타메이트 (glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포내로 유입되어 결국 과도 세포내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전 (Kang et al., *J Neurocytol.*, 30, pp945-955, 2001)과 허혈-재판류시에 갑작스러운 소 공급으로 인해 생체내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발되는 산화성 신경세포사, 2가지 기전에 있다 (Won MH, et al., *Brain Res.*, 836, 70-78, 1999; Sun AY, Chen YM. *J. Biomed. Sci.*, 5, pp401-414, 1998; Flowers F, Emerman JJ. *New Horiz.*, 6, pp169-180, 1998).

이러한 기전적인 연구를 바탕으로 해서 뇌허혈시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 끊임에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되었다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

지금까지 유일하게 뇌허혈 치료제로 FDA 공인 시판 중인 조직플라즈미겐활성자 (issue plasminogen activator)는 혈전용해제로 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 주는 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량 사용이나, 자주 사용시에는 혈관벽이 암아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하게 된다.

또한 초기의 칼슘 유입을 효과적으로 억제하기 위한 칼슘채널 억제제 (calcium channel blocker)인 MK-801의 경우 임상적 테스트가 실행이 되었으나 그 부작용으로 해 약물을 폐기한 바 있다.

한편 국내의 경우, 다수의 천연물질이 뇌졸중 예방에 효과가 있는 건강식품으로 판되고 있으나 이를 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며 오히려 건식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다.

따라서 식품으로 식이가능한 천연자원들을 객관적인 검증하여 뇌질환 치료 및 방효과를 갖는 천연물질을 개발하고자 하는 노력이 시급히 요구된다.

포도씨 (Grape Seed extract)는 해독, 살균 항암 효과를 지닌 카테chin 성분과 피의 탄력을 증진시키고 혈관을 강화시키는 피크나게들도 다량 함유되어 있는 것으로

고되어 있으며, 유해산소의 작용을 차단하는 항산화 효과도 있는 것으로 알려졌다.

본 발명자들은 포도씨가 뇌허혈성 신경세포사를 현저히 억제시킬 수 있는 활성 가침을 확인하여, 이를 근간으로 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 인체에 무해하며 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 방지할 수 있는 천식품 수출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 수출물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 상기 포도씨 수출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 수출물을 제공한다.

또한, 본 발명은 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 수출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 포도씨 수출물을 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매에 용한 것을 포함한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 포도씨 물 수출물은,

(a) 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 약 1 내지 20배의 부피, 바람직하게는 내지 12배의 물을 가한 후, 20 내지 50°C, 바람직하게는 상온에서, 약 1시간 내지 1. 바람직하게는 12시간 내지 1일 교반하면서, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨과 같은 강염기를 하여 pH를 8 내지 11, 바람직하게는 pH 10으로 조정하여 약 1시간 내 24시간 교반추출하는 제 1 단계;

(b) 상기 추출액에 염산과 같은 강산을 하여 pH를 2 내지 4, 바람직하게는 pH 2로 조정한 후, 원심분리하여 침전물만을 회수하는 제 2 단계;

(c) 상기 침전물에 중량비 약 3 내지 7배, 바람직하게는 약 5배량의 에탄올, 메타노 등과 같은 저급알코올을 하여 혼탁시키고, 원심분리한 상층액을 강약농축시키는 제 3 단계;

(d) 상기 농축액에 등량의 헥산과 같은 유기용매를 하여 진탕한 후, 상층액인 산을 제거하고 남은 액을 정제, 등검건조하는 제 4 단계로 이루어진 제조 공정을 함하는 제조방법으로 수득된다.

따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로부터 수득되는 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 수출물을 제공한다.

상기 물에 의한 포도씨 수출물 제조방법에서, 수산화나트륨 첨가 후 추출용액의 pH가 8.0 이하일 경우, 효소저해제의 수출효율이 현저하게 감소되므로 추출용액의 pH 8.0 이상으로 조정하여 추출하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명의 포도씨 에탄올 추출물은, 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 8 내지 20배의 탄소수 1 내지 4의 저급암산 또는 탄과 이급의 혼합용매, 바람직하는 50 내지 100% 에탄올을 가하여 상온 내지 100°C에서 약 1시간 내지 24시간동안, 1 내지 5회 침지, 교반추출, 열수추출 또는 환류냉각추출하고, 강압농축 또는 건조 25 켜 수득할 수 있다.

부가적으로 상기 물 기용 추출물 또는 저급 암고을 기용 추출물을 물에 혼탁한 26 이들 혼탁액의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 에틸아세테트와 같은 저급 아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 디클로로메탄, 사염화탄소 등과 27 은 비극성 용매를 가하여 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 4회 분획하여 비극 28 용매기용층 및 수가용층을 수득할 수 있다. 또한 추가로 등상의 분획 공정을 수행 29 수도 있다 (Harborne J.B.: *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., p 6-7, 1998).

본 발명의 바람직한 실시예에서는 에탄올로 추출, 농축한 뒤 상기 농축액에 등 30 의 혼산을 가하여 진탕한 후, 상등액인 혼산층을 제거하고 남은 액을 등결건조하여 31 2색의 분말을 얻는다.

상기 포도씨 추출물은 포도 (*Vitis vinifera* L.), 유럽산 포도 (*Vitis vinifera*), 32 국산 포도 (*Vitis labrusca*), 강변 포도 (*Vitis riparia*), 사막 포도 (*Vitis 33 pectinifera*), 겨울 포도 (*Vitis berlandieri*), 머두 (*Vitis coignetiae* Poirier ex 34 anchor), 왕머두 (*Vitis amurensis* Ruprecht), 까마귀머두 (*Vitis ficifolia* Bunge), 35 머두 (*Vitis flexuosa* Thunb.) 등의 포도씨로부터 추출된 추출물을 포함한다.

본 발명의 상기와 같이 얻어진 포도씨 추출물은 PC12 세포주에서의 턱테이트 디드모게나이제 (LDH) 를 감소시키고, 저린을 이용한 동물실험에서도 포도씨 추출물을 구부여서 CA1영역의 신경세포를 보호하여, 뇌허혈에 의한 신경세포 손상을 현저히 방할 수 있음을 확인하였다.

이에, 본 발명은 상기 제조방법으로 수득된 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 제공하며, 이는 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌질환을 예방하고 치료하는 도로 사용할 수 있다.

이에, 본 발명은 신경세포보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

상기 신경세포사에 의하여 유발되는 뇌질환으로는 뇌출증, 중증, 파킨슨병, 현던병, 피크 (Pick) 병 및 크로이즈펠트-야콥 (Creutzfeld-Jakob) 병이 있다.

상기 본 발명의 포도씨 추출물을 함유하는 뇌질환 예방 및 치료용 학조성물은, 조성을 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 50 중량%로 포함한다. 포도씨 추출물의 함량이 0.001 중량% 미만인 경우 효과적인 효능을 위해선 다른 투여가 필요할 수 있으며, 50 중량% 초과하는 경우 사용량에 비해 효능이 일정 수 있어 비경제적일 수 있다. 그러나 가장 바람직하기로는 뇌질환 예방 및 치료 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 포도씨 추출물의 함량을 적절히 조절하는 이 좋다.

본 발명의 포도씨 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 빙명의 수출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는, 닥토즈, 엑스트로즈, 수크로스, 솔비뮴, 만니뮴, 자일리뮴, 에리스리뮴, 밀티, 전분, 아카시아 고무, 암지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 살리케이트, 둘로즈, 메틸 셀룰로즈, 미경질 셀룰로즈, 플리비닐 피들리돈, 풀, 메틸하드득시벤에이트, 프로필하드득시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 있다.

본 빙명에 따른 수출물을 포함하는 조성물은, 각각 동상의 방법에 따라 산제, 립제, 정제, 캡슐제, 혼탁액, 에일션, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 제 및 면균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 약제 또는 식품으로 사용할 수 있으며, 약제로 용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하다. 상기 조성물의 제형은 용방법에 따라 달라질 수 있으나, 경고제 (PLASTERS), 과립제 (GRANULES), 로션제 (LOTIONS), 산제 (POWDERS), 시럽제 (SYRUPS), 액제 (LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔 (AEROSOLS), 연고제 (OINTMENTS), 유동엑스제 (FLUIDEXTRACTS), 유제 (EMULSIONS), 혼제 (SUSPENSIONS), 침제 (INFUSIONS), 정제 (TABLETS), 주사제 (INJECTIONS), 캡슐제 (CAPSULES) 및 환제 (PILLS) 등으로 제조할 수 있다.

또한 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내 서 환성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋며, 1일 포도식 수출물을 기준으로 하였을 때 50 mg/kg (체중) 내지 500 /kg (체중)으로 투여할 수 있다.

또한 본 발명의 포도씨 수출물은 기타 식품의 주, 부원료 및 식품첨가제로서 용이 가능하다.

또한 본 발명은 포도씨 수출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제 포함하는 뇌질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

본 발명의 수출물을 포함하는 조성물은 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 약제, 식 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 수출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 들풀, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이다.

본 발명의 수출물을 자체는 특성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

본 발명의 상기 수출물은 뇌질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 가될 수 있다.

본 발명의 건강 음료 조성물은 필수 성분으로서 상기 수출물을 함유하는 외에는 체성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천 단수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 단수화물의 예는 노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당일물이다. 상술한 것 이외의 미제로서 천연 향미제(타우마린, 스테비아 수출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리세린) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20

바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성
미체 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 백트산 및
의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 클로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제
방부제, 글리세린, 일률, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그
에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조
위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할
있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 g
부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 신경세포사에 의한 뇌질환 치료 및
방을 위한 용도, 특히 뇌허혈에 의한 질환을 예방 및 치료하기 위한 용도로 사용할
있다.

이하 본 발명의 실시예 및 실험예를 기재한다. 하기 실시예 및 실험예에는 본 발
을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니

시례 1. 포도씨 추출물의 제조

포도씨에 물을 가하여 pH를 조절해서 추출하는 본 발명에 의한 추출 방법에 의
여 추출물을 얻고, 또한 종래의 에탄올 추출방법에 의해 추출하여 추출물을
었다.

1. 포도씨 추출물 제조

건조하여 파쇄한 포도씨 1kg에 10배량의 물을 가한 후 교반시키면서 수산화나트(NaOH)을 가하여 pH를 10으로 조정한 후 6시간 상온에서 교반 추출하였다. 얻어진 출액에 염산(HCl)을 가하여 pH가 3이 되도록 조정한 후 원심분리하여 침전물 100g 회수하였다. 얻어진 침전물 100g에 중량비 5배량의 에탄올을 가하여 혼탁시키고 심분리한 상동액을 감압 농축시킨 후 농축액 50g에 등량의 헥산을 가하여 상동액을 거하고 하층액을 등결 건조하여 갈색의 분말 30g을 수득하였다.

2. 포도씨 에탄올 추출물 제조

건조하여 파쇄한 포도씨 1kg에 10배량의 50% 내지 100% 에탄올을 가하고 상온에 교반시키면서 12시간 추출하여 여과한 후 1/10 부피로 감압농축시켰다. 농축액 8g에 등량의 헥산을 가하여 상동액을 제거하고 하층액을 등결 건조하여 갈색의 분말 0g을 수득하였다. 이렇게 완성된 추출물을 10 mL의 물에 녹인 것을 원액(100 mg 추출물/mL 물)으로 하여 실험에 사용하였다.

험에 1. 포도씨 추출물의 저산소환경에서 세포 보호효능 검증-락테이트 디하드로게나제 측정 (*in vitro*)

PC12 세포에 COCl_2 을 뿌여하여 저산소환경을 통한 신경세포손상을 유도한 후, 경세포의 손상 유무를 확인하기 위해 배양세포에서 세포밖의 배양액으로 준비되는 테이트 디하이드로게나제(LDH) 농도를 측정하였다. 이는 손상 및 파괴된 세포로부터

거의 분비가 완료되는 20-24시간 정도에서 세포배양액을 채취하여 마이크로플레이리더를 사용하여 측정하였다.

실시에 1에서 준비한 포도씨 추출물을 저산소환경 유도 전 또는 후에 PCI2세포 0, 10, 50, 100, 500 및 1000 μ g/ml로 각각 처리하고, 37 °C에서 20 내지 24시간 양한 다음 세포 배양액을 수득하였다. 배양액은 총생 바이오티크 (Zhong Sheng otech) 표준시약을 가지고 Beckman DU-640 흡광광도계를 이용하여 효소역학적 (enzyme dynamic) 방법으로 실시하여 락테이트 디하이드로게나제의 능도를 측정하였

그 결과는 도 1에 도시한 바와 같다. 도 1에서 저산소환경 유도전 및 유도 후 포도씨 추출물을 처리한 실험군은, 용매만을 처리한 대조군에 비하여 락테이트 디하이드로게나제의 분비율이 처리 능도에 따라 감소하였다. 따라서 포도씨 추출물은 산소환경에 의해서 유도되는 세포사를 현저하게 감소시킬을 확인할 수 있었으며, 능도에서도 세포 특성이 거의 없었다.

험에 2. 포도씨 추출물의 신경세포 보호효능 검증-동물실험 (*in vivo*)

저빌을 이용한 동물실험으로 포도씨 추출물의 신경세포사 억제효과를 확인하였

실험동물의 사육 및 투여방법

실험동물로 체중 65-75 g의 수컷 및 암컷 몽골리안 저빌 (Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*) 60 마리를 사용하였다.

실험동물은 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기 하에서 온 23 °C와 상대습도 55 %로 사육하였다. 음식과 물은 자유로이 섭취하게 하다.

실험

실험동물에 포도식 추출물을 허혈유발 전 30분 또는 허혈유발 후 30분에 식도용 1㎖를 이용하여 0.5 ml 경구투여 하였다. 대조군으로는 아무런 풍질도 투여하지 있다. 이후 실험동물은 질소와 산소가 7 : 3으로 혼합된 가스에 3 % 이소플루란 (isoflurane, Baxter사, USA)으로 전신마취하였고, 동일한 가스에 2.5 % 이소플루란으로 마취를 유지하면서 수술을 수행하였다. 목 부위의 털을 깎고 소독한 다음 절개하여 양쪽 온목동맥 (common carotid arteries)을 노출시키고, 동맥류 클립 (aneurysm clip, Steelting, USA)을 이용하여 5 분 동안 결찰하여 허혈을 일으킨 후 털을 제거하여 재관류시켰으며, 대조군은 용매만을 투여하여 동일한 수술을 시행하였으며, 이 때 각 실험군은 경안경 (ophthalmoscope)을 이용하여 망막증심동맥 (central artery of retina)의 혈액 순환 유무를 관찰하여 완전한 온목동맥의 폐쇄를 인하였다. 허혈을 유발시키는 동안 직장 내 채온계를 삽입하여 채온을 측정하고, 험동물의 온도에 따라 자동으로 조절되는 온열 패드를 사용하여 채온을 정상 채온 37 ± 0.3 °C로 일정하게 유지시켰다.

정상군, 대조군 및 각 실험군은 뇌허혈 유발 4일 후에 티오멘탈 소듐 (thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 kg 당 각각 40 mg의 용량으로 복강 내 사하여 마취시킨 다음 1.000 ml 당 해파린 1000 IU를 함유한 4 °C의 생리식염수를 심실로 주입하여 판류 세척하였다. 판류 세척이 끝난 동물은 바로 4 °C의 4 % 파

포름알데하이드 (in 0.1 M phosphate buffer: PB, pH 7.4)로 판류 고정을 하였다. 고정이 끝난 동물을 뼈집단기름을 이용하여 머리뼈공간을 열어 뇌를 직출한 다음 일 고정액에서 4-6 시간 후고정하였다. 후고정이 끝난 뇌는 30 % 슈크로스 용액 (0.1 M phosphate buffer)에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 담구어 두었다. 이 후 라이드 마이크로트(sliding microtome, Reichert-Jung사, Germany)으로 조직을 30 두께로 잘라 보존액(storing solution)이 들어있는 6 웨n 플레이트에 넣어 사용시 지 4 °C에서 보관하였다.

각 조직절편 중에서 해마복합체(hippocampal formation)가 잘 나와 있는 조직을 선택하고, 조직에 묻어있는 보존액을 없애기 위해 0.01 M PBS로 10분씩 3회 세척한다. 이를 젤라틴 입힌 슬라이드 상에 두고 37 °C에서 충분히 건조시켰다. 이후 투수에 잠시 담구어 둔 후 2 % 크레실 바이오不太好 아세테이트(cresyl violet estate, Sigma사, USA) 용액에 1분간 염색하였다. 조직은 흐르는 물에 충분히 세척하여 슬라이드에 묻어 있는 과량의 염료를 제거하고, 증류수에 잠시 담근 후 50 %, 50 %, 80 %, 80 %, 95 % 및 100 % 용액을 거쳐 탈수 및 과량의 크레실 바이올렛을 제거하였다. 조직에서 니슬소체(Nissle body)가 보이는 것을 확인한 다음 자일렌(unseii사, Japan)에 담구어 무명화한 다음, 카나다 발삼(Canada Balsam, Kento사, pen)으로 봉입하였다.

각 조직들은 디지털 카메라가 부착되어 있는 Axioplan microscope (Carl Zeiss, Germany)로 CA1 영역을 1000배로 사진촬영하였다. 보라색으로 염색된 부문을 이지 분석기(Optimas 6.5, USA) 프로그램을 사용하여 선택하고, 신경세포를 계수하였다. 각 군에 대한 유의성의 검증을 위하여 살아남은 신경세포의 수를 정상군의 신경

포수로 나누어 백분율로 표시하였으며, 통계적인 분석을 위해서 원-웨이 ANOVA 테스트(One-way ANOVA test)를 수행하였다. 또한 각 군 중에서 가장 일반적인 부분을 라 Axioophot microscope(Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 사진 촬영을 하였다.

실험결과

각 실험군의 해마조직 염색사진은 도 2, 3 내지 4에 나타내었다.

도 2는 실험동물에 허혈-재관류를 실시하였을 때 정상군(A 및 C)과 대조군(B 및 D)의 해마조직 염색사진이며, C 및 D 각각은 A 및 B의 CA1영역을 400배로 확대 촬영 사진이다.

도 2에서 정상군은 CA1영역에서 신경세포가 관찰되는 반면에 대조군에서는 허혈 의해 세포가 죽어 염색된 신경세포가 관찰되지 않았다.

포도씨 추출물을 투여한 실험군에서의 결과를 살펴보면 도 3 및 4와 같다. 도 3에서 A 및 C는 포도씨 추출물을 뇌허혈 유발 30분전에 처리한 것이고, B 및 D는 뇌 혈 유발 30분후에 포도씨 추출물을 처리한 것이며, A와 B는 수컷, C와 D는 암컷이다. 수컷과 암컷 모두에서 뇌허혈 유발 전 및 유발 후에 포도씨 추출물을 투여한 경 세포사 억제 효과가 관찰되어 CA1영역의 세포가 진하게 염색되는 것을 관찰할 수 있다. 도 3의 사진은 모두 25배로 촬영한 것으로, 도 3의 CA1 영역만을 400배로 대하여 관찰하여 도 4로 나타내었다. 도 4에서 뇌허혈 유발 전과 유발 후 포도씨 추출물을 처리한 실험군 모두에서 세포 모양이 음성대조군(도 2의 A 및 C)과 유사하게 관찰되어, 포도씨 추출물이 뇌허혈시 신경세포 보호효과가 탁월한 것을 확인할 수 있었다.

또한 허혈-재판류 실시 후 포도씨 수출물의 적용여부 및 적용방법에 따른 신경세의 사멸정도를 신경세포 계수로 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5는 정상군 (Normal), 대조군 (Control), 허혈-재판류 실시 이전 포도씨 수출물 처리한 실험군 (pre-male, pre-female) 및 허혈-재판류 실시 후 포도씨 수출물 처리한 험군 (post-male, post-female)에서 측정된 신경세포수를 움성대조군에서의 계수한 경세포 수로 나누어 백분율로 표시한 것이다. 별표는 99 % 신뢰수준에서 효능이 것을 나타낸 것이다.

도 5에서, 대조군에서는 정상군에 비하여 약 11.6 % 정도의 생존율이 관찰되었다. 포도씨 수출물을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 높은 신경세포 생존율 관찰되었다. 또한 실험군에서 뇌허혈 유발 전에 포도씨 수출물을 투여한 실험군 신경세포 생존율은 수컷과 암컷에서 59.6 %, 57.4 %이며, 뇌허혈 유발 후에 포도 수출물을 투여한 실험군의 신경세포 생존율은 수컷과 암컷에서 51.9 %, 71.9 %인으로 확인되었다.

상기한 결과는 세포생존율의 비교약물인 에브셀렌 (Ebselen)에 의한 세포 생존율 50-60 %인 것을 고려하여 보면, 포도씨 수출물의 신경세포 보호효과가 천연물임에 불구하고 매우 우수함을 입증하는 것이다.

따라서 시험관내 실험 및 생체내 실험을 통하여 포도씨 수출물이 뇌허혈 발생에 따른 신경세포사를 매우 효과적으로 보호함을 알 수 있었으며, 포도씨 수출물의 치적인 복용으로 뇌졸증 등의 뇌질환을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

험에 3. 금성독성 실험

경구투여

ICR계 마우스와 스프라그 도울리 뱃트룹 각각 10마리씩 4군으로 나누어 본 발의 포도씨 추출물을 각각 100, 250, 500 및 1000 mg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 주간 독성여부를 관찰한 결과 4군 모두에서 사망한 예가 한 마리도 없었고 외견상 조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

복강투여

ICR계 마우스(몸무게 25 ± 5 g)와 스프라그 도울리 뱃트룹 각각 10마리씩 4군로 나누어 본 발의 포도씨 추출물을 각각 25, 50, 100 및 200mg/kg의 용량으로 강투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 4군 모두에서 사망한 예가 한 마도 없었고 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

실험 결과, 본 발의 포도씨 추출물은 금성독성이 거의 없음이 확인되었다.

본 발의 포도씨 추출물은 아래와 같은 제형으로 투여할 수 있으며, 아래의 제에는 본 발의 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발의 내용이 제한되는 것은 아다.

제예. 뇌허혈성 신경세포 손상 방지용 조성물의 제조에

주사제 제조

실시에 1의 포도씨 수출물 100 μ g, 소다음 메타비설파이트 3.0 μ g 및 메틸파라 0.8 μ g, 프로필파리핀 0.1 μ g을 주사용 멀균증류수에 혼합하여 최종 부피 2 mL의 구사제를 제조한 후 염출하여 멀균한다.

정제 제조

실시에 1의 포도씨 수출물 200 μ g, 유당 100 μ g, 전분 100 μ g 및 스테아린산 그네슘 600 μ g을 혼합하고 타정하여 정제를 제조한다.

캡슐제 제조

실시에 1의 포도씨 수출물 100 μ g, 유당 50 μ g, 전분 50 μ g, 탈크 2 μ g 및 스테아린산 마그네슘 600 μ g을 혼합하고, 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

액제 제조

실시에 1의 포도씨 수출물 1000 μ g, 설탕 20 g, 이성화당 20 g 및 적량의 대문을 정제수에 가하여 총 100 mL을 제조하고, 갈색병에 충전하고 멀균시켜 액제를 제한다.

건강 식품의 제조

실시에 1의 포도씨 건조수출물 1000 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오판 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg), 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼

90 ms, 탄산황슘 100 ms, 염화마그네슘 24.8 ms)을 혼합하고, 기타 식품첨가제를
가하여 건강식품을 제조한다.

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을
람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하
. 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고.
상의 방법에 따라 건강식품 조성을 제조에 사용할 수 있다.

건강 음료의 제조

실시예 1의 포도씨 건조추출물 1000 ms, 구연산 1000 ms, 올리고당 100 g, 매실
죽액 2 g, 타우린 1 g, 경제수를 가하여 전체 900 ml를 만들어 통상의 건강음료 제
방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85°C에서 교반 가열한 후.
들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 리터 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관
다음 본 발명의 건강음료 조성을 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바탕으로 실시예로 혼합 조성
되었지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배
비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과】

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 포도씨 추출물은 뇌허혈시 발생되는 신경세
사를 저해하는 효과가 탁월할 뿐만 아니라 인체에 무해하여 신경세포의 괴사에 의
발생되는 뇌질환을 예방 및 치료하기 위한 용도로 사용가능하다.

특허청구범위】

【구항 1】

(a) 건조하여 파쇄한 포도씨 무게 (kg)의 약 1 내지 20배의 부피의 물을 가한
. 20 내지 50°C에서 약 1시간 내지 3일 교반하면서, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨

같은 강염기류를 가하여 pH를 8 내지 11로 조정하여 약 1시간 내지 24시간 교반수
하는 제 1 단계:

(b) 상기 추출액에 염산과 같은 강산을 가하여 pH 2 내지 4의 범위로 조정한
. 원심분리하여 침전물만을 회수하는 제 2 단계:

(c) 상기 침전물에 중량비 약 3 내지 약 7배량의 에탄올, 메탄올 등과 같은 저
압력을 가하여 혼탁시키고, 원심분리한 상동액을 감입능속시키는 제 3 단계:

(d) 상기 능속액에 등량의 헥산과 같은 유기용매를 가하여 진탕한 후, 상동액인
염산을 제거하고 남은 액을 경제, 등결건조하는 제 4 단계로 이루어진 제조 공정을
함하는 제조방법으로부터 수득되는 신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물.

【구항 2】

신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방
치료용 조성물.

영구항 3]

제 2항에 있어서, 상기 수출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급일률 및 이들의 혼물로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 용매에 기용한 수출물인 조성물.

영구항 4]

제 3항에 있어서, 상기 수출물은 제 1항의 수출물인 조성물.

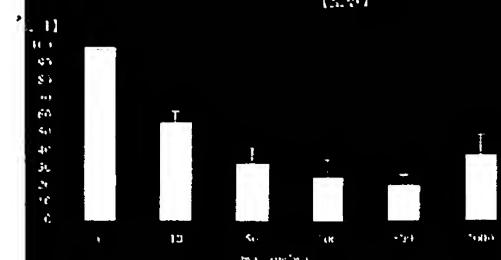
영구항 5]

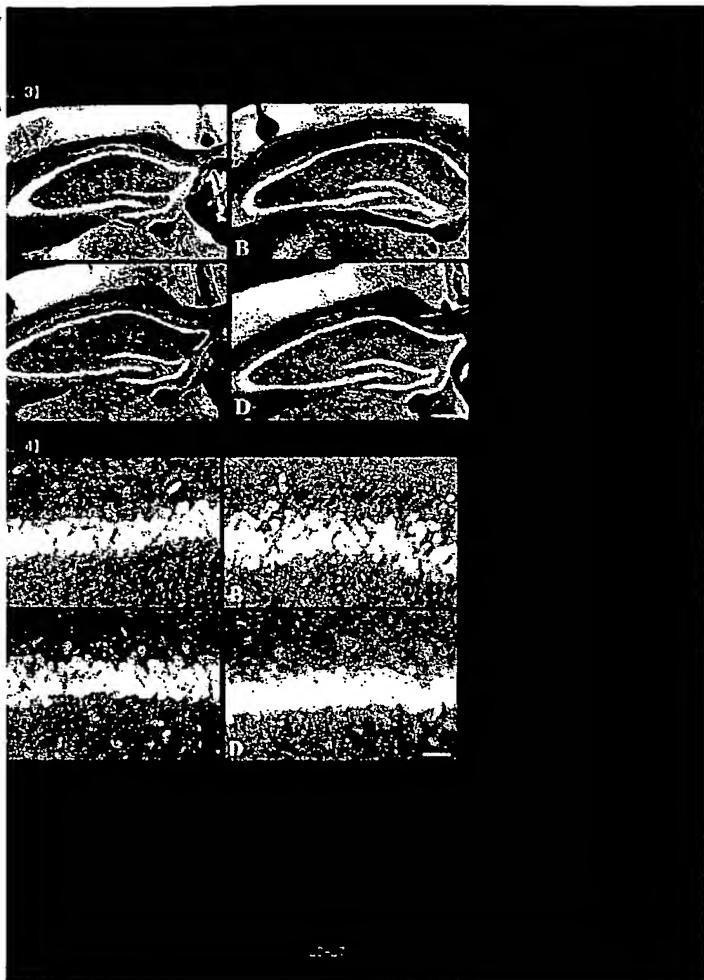
제 2항에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌줄증, 중증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 또는 크로이즈펠트-야콥(Creutzfeld-Jakob) 병인 것인 조성물.

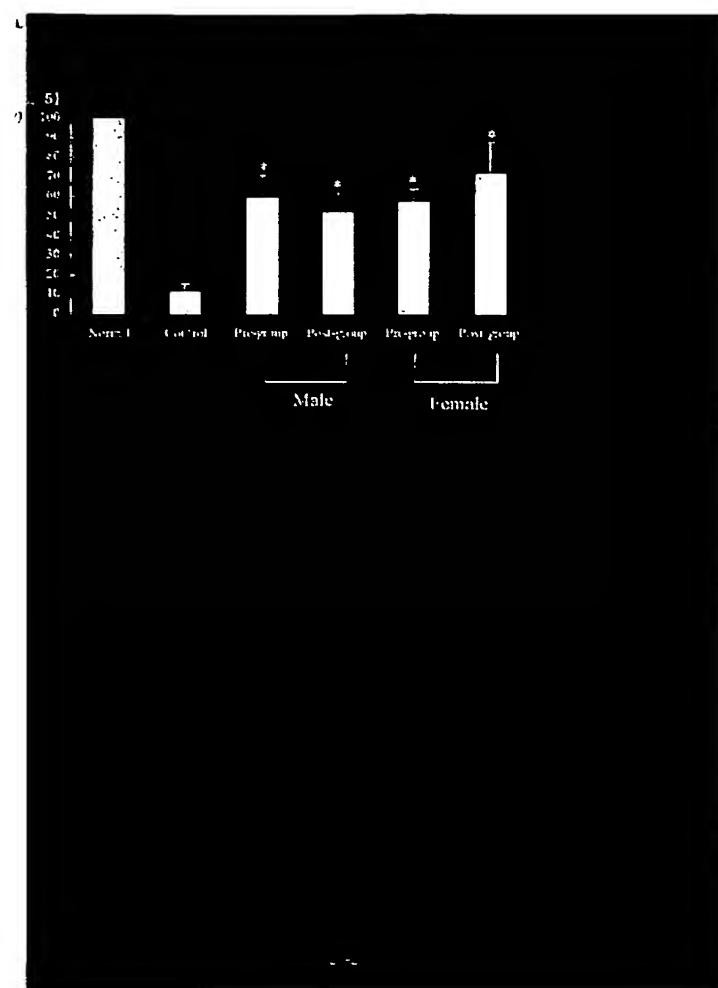
영구항 6]

신경세포 보호활성을 갖는 포도씨 수출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보첨가제를 포함하는 건강기능식품.

(5,9)







Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002793

International filing date: 02 November 2004 (02.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0078503
Filing date: 07 November 2003 (07.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 12 November 2004 (12.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.